

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16483

研究課題名（和文）KIF1Aモータードメイン変異による神経変性疾患の発症機構とその構造生物学的解析

研究課題名（英文）Pathogenesis of neurodegenerative disease caused by kinesin mutation and its structural analysis

研究代表者

森田 真夏（森川真夏）（Morita, Manatsu）

東京大学・大学院医学系研究科（医学部）・特任研究員

研究者番号：80854885

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：神経変性疾患のひとつである軸索型シャルコー・マリー・トゥース病（CMT2）は、筋萎縮や感覚障害を呈する疾患であるが、その発症メカニズムの全貌は未だ解明されていない。本研究課題では、CMT2の患者家系において見つかった分子モーターKIF1Aの変異に着目し、この変異型KIF1Aの性質を解析した。その結果、変異型KIF1Aでは、分子内の「モータードメイン」と「ネックドメイン」という2領域が異常に強く引き合うことで、軸索での運動が遅くなり、細胞内輸送が妨げられ、CMT2の発症につながる事が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで研究されてきたKIF変異によるシャルコー・マリー・トゥース病は、KIFのカーゴ結合機能の障害によるものが多かったが、今回初めてモータードメインの構造変化の障害による発症メカニズムが明らかになった。また本研究により、KIF1Aの微小管上運動の作動機構の理解を、分子内相互作用の観点から深めることができた。さらに、本研究課題で着目したKIF1A変異はシャルコー・マリー・トゥース病の患者家系だけでなく、痙性対麻痺や遺伝性感覚性自律神経障害の患者でも見つかったことから、今回の成果は、神経変性疾患に対する分子標的治療や創薬に繋がる事が期待される。

研究成果の概要（英文）：Charcot-Marie-Tooth disease (CMT2) is a neurodegenerative disease that causes muscle atrophy and sensory deficits in the lower and upper extremities. However, the pathogenesis of CMT2 remains unclear. In this study, we focused on a mutation of the molecular motor KIF1A found in a CMT2 patient family and analyzed the nature of this mutant KIF1A. The results revealed that in the mutant KIF1A, two regions of the molecule, the “motor domain” and the “neck domain”, attract each other abnormally strongly, which prevents intracellular transport and leads to the onset of CMT2.

研究分野：細胞生物学

キーワード：神経変性疾患 シャルコー・マリー・トゥース病 分子モーター キネシン KIF1A

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経細胞の軸索は時に1mになるにも関わらず、軸索内にタンパク質合成装置がほとんどないため、軸索で必要なタンパク質は細胞体で合成された後、キネシンなどの分子モーターによって輸送される[1]。キネシンは45種以上あり、それぞれが担当するカーゴと結合し、ATPの加水分解エネルギーを利用しながら微小管の上を一方方向に動く。動くために必要な動力部であるモータードメインと、モータードメインから続くネックリンカーというヒモ状構造は、どのキネシンもほぼ共通している。

シャルコー・マリー・トゥース病 (CMT) は、下肢から始まる筋萎縮と感覚障害が上肢にまで進行し、QOLが大きく低下する末梢神経性の神経変性疾患である。有病率は1/2500人で、世界中に約260万人もの患者がいる[2]。CMTの原因遺伝子は80種類以上も特定されているが、その発症メカニズムの全貌は未だ解明されておらず、CMT特異的に効果のある治療法は開発されていない[3]。

CMTの原因遺伝子のひとつに、キネシンの一種であるKIF1B8が知られている[4]。CMT患者のKIF1B8では、カーゴ結合機能の異常によってインスリン様成長因子1受容体(IGF1R)の軸索輸送が障害されることが近年報告された[5]。このことからKIF1B8の輸送の障害によるIGFシグナル伝達の低下が神経変性の一因と考えられていた。

本課題では、KIF1B8とは別のキネシンであり、シナプス小胞前駆体を輸送するKIF1Aの一塩基ミスセンス変異をもつ軸索型CMT(CMT2)患者家系に注目し、研究を始めた。KIF1Aの変異アミノ酸は、カーゴ結合領域ではなく、モータードメイン内のB7領域にあり、電荷の逆転を生じる。B7領域は、モータードメインが動力を発揮する上で重要な要素とされてきたATP結合領域でも、微小管結合領域でもない領域で、その機能は不明であった。

2. 研究の目的

未解明の分子内相互作用が予想されるB7領域とネックリンカーの結合を探索し、キネシンの駆動メカニズムの理解を深めることにより、B7領域の異常機能がなぜCMT発症に繋がるのかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、(1) B7領域の異常が、一次感覚神経細胞であるマウス脊髄後根神経節(DRG)ニューロンの軸索輸送へ与える影響を調べた。また、(2) B7領域の機能をネックリンカーとの相互作用の観点から検討し、B7変異によるCMT発症の一因を探った。

(1) B7領域がDRGニューロンの軸索輸送へ与える影響

- ① DRGニューロンの軸索内で、野生型および変異型KIF1Aのモーター活性に違いがあるかを調べるため、蛍光標識した変異体と野生型KIF1AをアデノウイルスでDRGニューロンに強制発現させ、軸索輸送のライブイメージングを行った。コンフォーカルレーザー顕微鏡を用いて観察し、軸索輸送の速度・頻度・方向について変異体の異常の有無を確認した。
- ② KIF1Aカーゴの局在解析を行った。CMTの末梢神経での病態を再現するため、*Kif1a*ヘテロマウスのDRGニューロンに、変異型ならびに野生型KIF1Aを導入し、KIF1A輸送に関わるTrkA、TRPV1、Rab3A、DENN/MADD、Synaptotagmin[7-9]の局在を調べた。

(2) B7領域の機能と、ネックリンカーとの相互作用

- ① B7領域の機能を調べるため、*in vitro*での野生型および変異型KIF1Aのモーター活性を比較した。精製しガラスに固定したKIF1Aが微小管を動かす速度や、微小管上運動に伴うATP加水分解速度を測定し、変異体でのモーター活性の低下を裏付けた。
- ② B7領域のX線結晶構造解析を行い、B7領域とネックリンカー構造関係を、野生型と変異型とで比較した。この際、ATPアナログを用いることで加水分解途中の遷移状態を作り出し、ATP加水分解に依存的な構造変化を明らかにした。さらに構造情報を元に、B7領域とネックリンカーの結合を野生型と変異型とで比較するため、既に所属研究室にて確立されている質量分析を応用した網羅的・定量的な測定系[6]に基づき、B7領域とネックリンカーの結合能を定量した。

4. 研究成果

本研究では、CMT2 の患者で同定された KIF1A モータードメイン $\beta 7$ 領域の E239K 変異に着目した。 $\beta 7$ 領域の軸索輸送における役割と CMT2 発症との関係を明らかにし、この成果を最終年度の 2022 年 1 月に the EMBO Journal に発表した[10]。

まず、この変異が KIF1A カージョの局在に与える影響を調べた。KIF1A ヘテロマウスの DRG ニューロンで有意に減少していた軸索表面の TrkA の局在を、変異体はレスキューすることができなかった (図 1)。同様に、細胞表面の TRPV 1 や、Rab3A, synaptotagmin, DENN/MADD などについても、変異体では十分にレスキューすることができなかった。

次に、野生型および変異型 KIF1A の軸索輸送のライブイメージングを行ったところ、変異体の輸送スピードが 20%ほど遅いことが明らかになった (図 2A)。動きの方向性は、野生型も変異型も約 90%が順向性で、違いはなかった (図 2B)。さらに *in vitro* での運動活性を測定すると、やはり変異型で速度が遅く (図 3A)、微小管存在下での ATPase 活性も変異型で低かった (図 3B)。一方で、微小管への親和性は、変異型と野生型は同等であった。

また、X線結晶解析では、変異体で $\beta 7$ 領域に過剰な正電荷が生じ、それがネック領域の負電荷と静電的に相互作用し、Dock 構造を取る様子が可視化された (図 4)。また、定量的質量分析により、この変異は Dock 構造状態の ATP 加水分解後期に、モーターとネックの相互作用を過剰に安定化することが示された。

以上からこの変異体では、ATP 加水分解サイクルに伴うネック領域の構造変化が妨げられることで、モーター活性が低下していると考えられた。(図 5)

この変異は、gnomAD (v3.1) によると 10 万人あたり 7-8 人の割合で存在し、CMT 以外にも、痙攣対麻痺、遺伝性感覚性自律神経ニューロパチーの患者で 24 件の報告がある。 $\beta 7$ 領域は神経維持機能の面で KIF1A のモーター活性に重要な役割を果たすことが明らかになった。

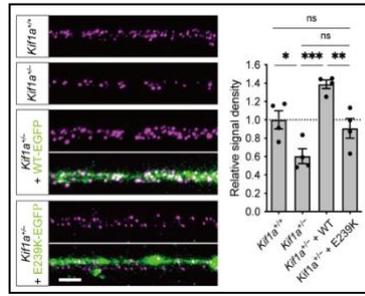


図 1 DRG ニューロン軸索の細胞表面の TrkA の局在。

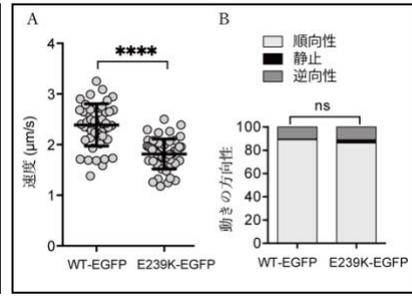


図 2 野生型 (WT-EGFP) と変異型 KIF1A (E239K-EGFP) が軸索内を動く速度 (A) とその方向性 (B)。

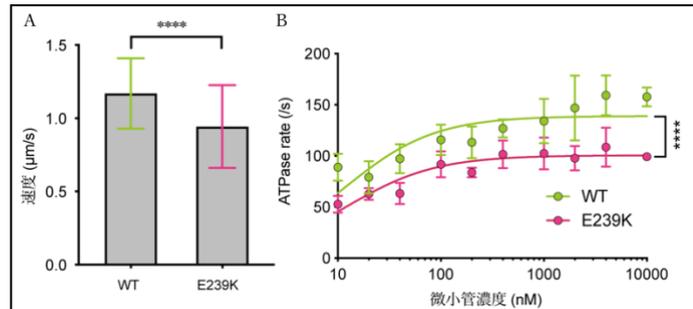


図 3 (A) Gliding アッセイを行い、ガラス表面に固定した野生型 KIF1A と変異型 KIF1A が微小管を動かす速度を測定した。(B) 野生型 KIF1A と変異型 KIF1A の ATPase 活性。

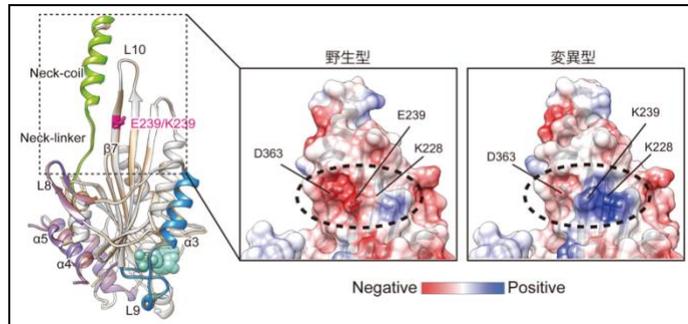


図 4 X線結晶構造解析による野生型 KIF1A 構造と変異型 KIF1A 構造。2つの分子モデルを重ね、変異型 KIF1A の構造を茶色で示した。拡大図はネックリンカーと $\beta 7$ の周辺領域の表面電荷を示す。

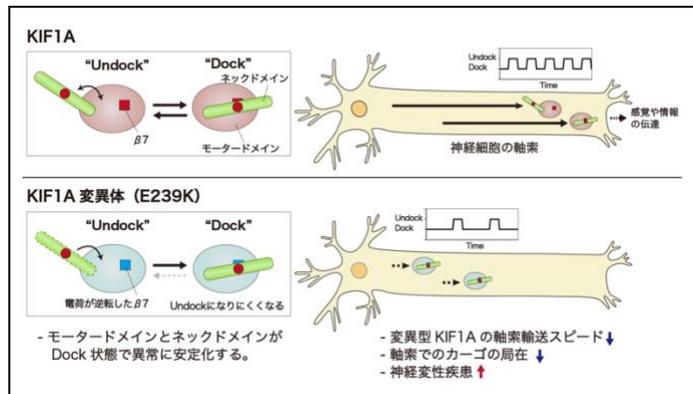


図 5 Dock, Undock の構造変化を繰り返すことで KIF1A は細胞内でカージョを運ぶ。変異体では Undock になりにくく、軸索輸送スピードが低下する。

<引用文献>

1. Hirokawa N. Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science* (80). 1998;279: 519-526. doi:10.1126/science.279.5350.519
2. Ben Othmane K, Middleton LT, Loprest LJ, Wilkinson KM, Lennon F, Rozear MP, et al. Localization of a gene (CMT2A) for autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth disease type 2 to chromosome 1p and evidence of genetic heterogeneity. *Genomics*. 1993;17: 370-375. doi:10.1006/geno.1993.1334
3. Ekins S, Litterman NK, Arnold RJG, Burgess RW, Freundlich JS, Gray SJ, et al. A brief review of recent Charcot-Marie-Tooth research and priorities. *F1000Research*. 2015;4: 1-15. doi:10.12688/f1000research.6160.1
4. Zhao C, Takita J, Tanaka Y, Setou M, Nakagawa T, Takeda S, et al. Charcot-Marie-Tooth Disease Type 2A Caused by Mutation in a Microtubule Motor KIF1Bbeta. *Cell*. 2001;105: 587-597.
5. Xu F, Takahashi H, Tanaka Y, Ichinose S, Niwa S, Wicklund MP, et al. KIF1B β mutations detected in hereditary neuropathy impair IGF1R transport and axon growth. *J Cell Biol*. 2018;217: 3480-3496. doi:10.1083/JCB.201801085
6. Ogawa T, Saijo S, Shimizu N, Jiang X, Hirokawa N. Mechanism of Catalytic Microtubule Depolymerization via KIF2-Tubulin Transitional Conformation. *Cell Rep*. 2017;20: 2626-2638. doi:10.1016/j.celrep.2017.08.067
7. Okada Y, Yamazaki H, Sekine-Aizawa Y, Hirokawa N. The neuron-specific kinesin superfamily protein KIF1A is a unique monomeric motor for anterograde axonal transport of synaptic vesicle precursors. *Cell*. 1995;81: 769-780. doi:10.1016/0092-8674(95)90538-3
8. Niwa S, Tanaka Y, Hirokawa N. KIF1B β - and KIF1A-mediated axonal transport of presynaptic regulator Rab3 occurs in a GTP-dependent manner through DENN/MADD. *Nat Cell Biol*. 2008;10: 1269-1279. doi:10.1038/ncb1785
9. Tanaka Y, Niwa S, Dong M, Farkhondeh A, Wang L, Zhou R, et al. The Molecular Motor KIF1A Transports the TrkA Neurotrophin Receptor and Is Essential for Sensory Neuron Survival and Function. *Neuron*. 2016;90: 1215-1229. doi:10.1016/j.neuron.2016.05.002
10. Morikawa M, Jerath NU, Ogawa T, Morikawa M, Tanaka Y, Shy ME, et al. A neuropathy-associated kinesin KIF1A mutation hyper-stabilizes the motor-neck interaction during the ATPase cycle. *EMBO J*. 2022;41: e108899. doi:10.15252/embj.2021108899

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Morikawa Manatsu, Jerath Nivedita U, Ogawa Tadayuki, Morikawa Momo, Tanaka Yosuke, Shy Michael E, Zuchner Stephan, Hirokawa Nobutaka	4. 巻 41
2. 論文標題 A neuropathy associated kinesin KIF1A mutation hyper stabilizes the motor neck interaction during the ATPase cycle	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 e108899
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embj.2021108899	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------